

ฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัดจากมะยมในการยับยั้งเชื้อสัญญาณ
แคลเซียม การยับยั้งจุลินทรีย์ และการต้านอนุมูลอิสระ

**Biological Activities of Crude Extract of
Phyllanthus acidus (L.) Skeel on the Inhibition of
Ca²⁺ Signal, Antimicrobial and Antioxidant Activity**

รัฐดา จันทร์กลิ่น* และศุภญา สิทธิจันทร์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

งามผ่อง คงคาทิพย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

Ruthada Chanklan* and Supaya Sittichan

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Ngampong Kongkathip

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkhen Campus,
Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

Received: October 2, 2018; Accepted: July 14, 2019

บทคัดย่อ

เมื่อนำสารสกัดหยาบเอทานอลจากลำต้นและใบมะยมมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น การยับยั้งเชื้อสัญญาณแคลเซียมซึ่งเกิดจากการกระตุ้นที่มากเกินไป ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งเชื้อสัญญาณแคลเซียมวิเคราะห์ด้วยการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* zds1Δ บนอาหารกึ่งแข็ง YPD ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ 165 มิลลิโมลาร์ สารสกัดหยาบจากใบมะยมออกฤทธิ์ยับยั้งการเชื้อสัญญาณแคลเซียมได้เมื่อใช้สารสกัด 5.00 และ 1.67 มิลลิกรัม ขณะที่สารสกัดจากลำต้นมะยมไม่สามารถลดการเชื้อสัญญาณแคลเซียมซึ่งเกิดจากการกระตุ้นที่ส่งผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบวิเคราะห์ด้วย disc diffusion ร่วมกับ broth microdilution และ agar microdilution ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากลำต้นมะยมสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes* TISTR1540, *Bacillus subtilis* TISTR008, *Staphylococcus aureus* TISTR885 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5013 โดย *S. aureus* TISTR885 เป็นแบคทีเรียที่มีความไวสูงสุดต่อสารสกัดหยาบจากลำต้นมะยม มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญ (minimum inhibitory

concentration, MIC) และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ฆ่าแบคทีเรีย (minimal bactericidal concentration, MBC) เท่ากับ 7.81 และ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากใบมะยมยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* TISTR5779 โดยให้ค่า MIC และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำลายรา (minimum fungicidal concentration, MFC) เท่ากับ 31.25 และ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม ทั้งสารสกัดจากใบและลำต้นมะยมไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* TISTR780 เมื่อใช้ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากลำต้นมะยมมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากใบมะยม โดยสารสกัดจากใบมะยมมีค่า IC_{50} ในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 30.34 และ 46.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากลำต้นและใบมะยมมีค่าเท่ากับ 68.95 ± 0.02 และ 47.37 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด เมื่อเปรียบเทียบเป็นปริมาณกรดแกลลิก

คำสำคัญ : ฤทธิ์ทางชีวภาพ; ตัวยับยั้งเชื้อสัณฐานแคลเซียม; สารต้านอนุมูลอิสระ; *Phyllanthus acidus*

Abstract

Crude ethanol extracts of leaf and stem of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeel were investigated on its biological activities i.e. the inhibition of hyper-activated Ca^{2+} signaling, antimicrobial growth and antioxidants activity. The Ca^{2+} -signal inhibitory activity was performed using *Saccharomyces cerevisiae zds1Δ*-growth base assay on YPD soft agar supplemented with 165 mM $CaCl_2$. Crude leaf extract exhibited inhibitory activity on Ca^{2+} -signal when 5.00 and 1.67 mg of sample were used, while crude stem extract could not attenuate the hyper-activated Ca^{2+} -signal inhibition growth of the strain. Antimicrobial activity of crude extracts was accomplished by disc diffusion following broth microdilution and agar dilution assays. Results showed that crude stem extract inhibited growth of tested-microorganisms such as *Enterobacter aerogenes* TISTR1540, *Bacillus subtilis* TISTR008, *Staphylococcus aureus* TISTR885 and *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5013. The *S. aureus* TISTR885 was demonstrated the highest susceptibility on crude stem extract with 7.81 and 31.25 mg/mL for minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC), respectively. Crude leaf extract inhibited growth of *Candida albicans* TISTR5779 with 31.25 and 125 mg/mL for MIC and minimum fungicidal concentration (MFC), respectively. However, both of crude ethanol extracts could not inhibit growth of *Escherichia coli* TISTR780 at 1,000 mg/mL of crude extract concentration used. Furthermore, antioxidant activity using the DPPH and ABTS assay of crude stem extract was higher than that of crude leaf extract. Crude stem extract exhibited the IC_{50} value on scavenging activity of DPPH and of ABTS cation radical with 30.34 and 46.09 μ g/mL, respectively. In addition, total phenolic content of crude stem and leaf extract was 68.95 ± 0.02 and 47.37 ± 0.01 μ g GAE/mg crude extract, respectively.

Keywords: biological activity; Ca^{2+} -signal inhibitor; antioxidant; *Phyllanthus acidus*

1. คำนำ

การเกิดโรคหลายชนิดมีสาเหตุจากความบกพร่องจากกระบวนการทางชีวภาพภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การแสดงออกของโรคหลายชนิด เช่น ไมเกรน เบาหวานชนิดที่ 2 โรคหัวใจ กล้ามเนื้อเสื่อม การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง กลุ่มอาการ neurodegenerative disorder เช่น อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน โรคลูปัส หรือภูมิแพ้ตนเอง (systemic lupus erythematosus, SLE) โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรง (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) มีหลักฐานบ่งชี้ว่าเกิดจากการสื่อสารสัญญาณแคลเซียมของเซลล์ประสาทมีความบกพร่อง (Capiod *et al.*, 2007; Bezprozvanny, 2009) หรืออาจเกิดจากการรักษาสมดุลของสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) ของเซลล์บกพร่องก็ส่งผลทำให้เกิดโรคมะเร็ง ข้ออักเสบ หลอดเลือดหัวใจตีบ อัลไซเมอร์ ทำให้เซลล์ชราและตายได้ รวมทั้งโรคติดเชื้อหลายชนิดที่ผู้ป่วยเกิดอาการของโรคติดเชื้อเนื่องจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องทำให้เกิดการแสดงออกของโรคได้เช่นกัน เช่น อาการตกขาวที่มีสาเหตุจากราในช่องคลอด (candidiasis)

กระบวนการทางชีวภาพของเซลล์ยูแคริโอตหลายกระบวนการ ได้แก่ การแบ่งเซลล์ การจดจำ การสืบพันธุ์ การเจริญเติบโต การทำงานของกล้ามเนื้อ การเคลื่อนที่ กระบวนการตายของเซลล์ การกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การแสดงออกของยีน เป็นต้น ต้องอาศัยแคลเซียมไอออนเป็นตัวสื่อสารสัญญาณอันดับที่ 2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการทางชีวภาพของเซลล์ เมื่อการนำสัญญาณแคลเซียมบกพร่องจะกระทบต่อกระบวนการทำงานของเซลล์ส่งผลทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้ การป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากความบกพร่องของการควบคุมกระบวนการทางชีวภาพภายในเซลล์จึงได้รับความสนใจเป็นอย่าง

มาก ปัจจุบันความนิยมบริโภคสมุนไพรทั้งในแบบอาหารเพื่อป้องกันการเกิดโรค หรือในแบบของยาเพื่อรักษาอาการของโรคมียิ่งเพิ่มมากขึ้น สมุนไพรหลายชนิดที่นำมาใช้ประโยชน์นั้น ได้รับการตรวจสอบและยืนยันผลสรรพคุณของสมุนไพรนั้นแล้ว แต่ก็ยังมีสมุนไพรอีกหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้บำบัดอาการของโรคบางชนิดได้ผล แต่ยังไม่มียางานผลการศึกษาที่ตรวจสอบและยืนยันผลสรรพคุณของสมุนไพรดังกล่าว

มะยม [*Phyllanthus acidus* (L.) Skeel] ชื่อสามัญ star gooseberry เป็นไม้ผลยืนต้นอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ผลและใบมะยมนำมาบริโภคเป็นอาหารสดโดยตรงหรือเป็นอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปหรือถนอมอาหาร ใบมะยมตัวผู้มีสรรพคุณแก้พิษคัน แก้พิษไข้หัวหรือไข้ฝีดาษ เหือด หัด สุกใส ตำแดง และใช้ปรุงในยาเขียว รากใช้แก้ไข้ แก้โรคผิวหนัง แก้ประดง แก้เม็ดผื่นคัน ขับน้ำเหลืองให้แห้ง (เต็ม, 2557) มีการใช้รากมะยมในการบำบัดอาการติดเชื้อ (Vongvanich *et al.*, 2000) อีกทั้งมีการใช้ใบมะยมสดต้มน้ำดื่มเพื่อลดน้ำตาลในเลือดสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นโรคหนึ่งที่เกิดสาเหตุของการเกิดโรคอาจมาจากความบกพร่องของการสื่อสารสัญญาณแคลเซียมภายในเซลล์ จึงเป็นไปได้ว่าใบมะยมมีสารออกฤทธิ์ที่อาจยับยั้งสัญญาณแคลเซียมได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งสัญญาณแคลเซียม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและลำต้นมะยม ซึ่งผลศึกษาที่ได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ป้องกันและบำบัดโรคที่เกิดจากความบกพร่องของการควบคุมกระบวนการทางชีวภาพภายในเซลล์

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา

2.1.1 ยีสต์ : *Saccharomyces cerevisiae* YNS17 (*MATa zds1::TRP1 erg3::HIS3 pdr1::hisG-URA3-hisG pdr3::hisG*), *S. cerevisiae* TISTR5013 และ *Candida albicans* TISTR5779

2.1.2 แบคทีเรีย : *Escherichia coli* TISTR780, *Enterobacter aerogenes* TISTR1540, *Bacillus subtilis* TISTR008 และ *Staphylococcus aureus* TISTR885

2.2 การเตรียมสารสกัดหยาบเอทานอลจากมะยม

ตัวอย่างใบและลำต้นมะยมที่ใช้ศึกษานี้ เก็บจากต้นมะยมที่ปลูกในบริเวณ อาคารเรียนและปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (บร. 5) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 นำตัวอย่างใบและลำต้นมะยมที่ล้างทำความสะอาดแล้วไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บดตัวอย่างมะยมที่ผ่านการอบแห้ง โดยใช้ตัวอย่างแห้ง 1 กิโลกรัม นำไปสกัดสารออกฤทธิ์ด้วยวิธีการแช่ตัวอย่าง (maceration technique) ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน เขย่าเป็นครั้งคราว กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 โดยสกัดซ้ำ 3 ครั้ง รวบรวมสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นภายใต้สุญญากาศ (rotary vacuum evaporator, BUCHI R-114/A, Switzerland) และสารสกัดหยาบเอทานอลที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสัณฐานแคลเซียม

ถ่าย *S. cerevisiae* YNS17 อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญในอาหารเหลว YPD (yeast extract, polypeptone, dextrose, adenine และ uracil ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 2.0, 0.04 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ตามลำดับ) ลงในอาหารกึ่งแข็ง YPD สูตร

เดียวกันที่มีการเติม agar 0.7 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ยังหลอมเหลว โดยใช้อาหารปริมาตร 8 มิลลิลิตร และมีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 165 มิลลิโมลาร์ ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ 3×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะที่ปราศจากเชื้อ ปล่อยให้เย็นและแข็งตัว (Chanklan et al., 2008a) จากนั้นหยดสารละลายสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบและลำต้นมะยม (ความเข้มข้นความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ปริมาณเนื้อสาร 5 มิลลิกรัม) ลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และใช้สารละลาย FK506 เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ปริมาณเนื้อสาร 0.48 นาโนกรัม) เป็นชุดควบคุมผลลบ (negative control) และชุดควบคุมผลบวก (positive control) ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน สังเกตการเจริญของยีสต์รอบรอยหยดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

2.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ด้วยวิธี disc diffusion

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่รีที่ใช้ทดสอบ คือ *E. coli*, *E. aerogenes*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ในอาหารเหลว MHB (Mueller Hinton broth) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของแบคทีเรียให้มีค่าเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 (McFarland standard No. 0.5) ใช้ไม้ปั่นสำลีปลอดเชื้อจุ่มสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบนำไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารแข็ง MHA (Mueller Hinton agar) นำ paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ชั้สารละลายสารสกัดใบมะยมเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (20 มิลลิกรัมต่อ disc) จนแห้ง แล้วนำไปวางบนผิวหน้าอาหารที่เกลี่ยไว้ นำ paper disc ขนาดเดียวกันชุบสารละลาย streptomycin

เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (50 ไมโครกรัมต่อ disc) ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก และนำ paper disc ชุบตัวทำละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) เป็นชุดควบคุมผลลบ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง เลือกรูปการทดสอบที่ให้ผลบวกนำไปทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบ (minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ฆ่าแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ (minimal bactericidal concentration, MBC) ต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ใช้วิธีการและความเข้มข้นของสารสกัดเช่นเดียวกันกับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยใช้ *S. cerevisiae* และ *C. albicans* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว sabouraud (sabouraud broth) ที่ 30 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชั่วโมง และปรับความขุ่นให้มีค่าเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 นำไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารแข็ง sabourad (sabouraud agar) ใช้สารละลาย ketoconazole เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (1 มิลลิกรัมต่อ disc) เป็นชุดควบคุมผลบวก และใช้ DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ แล้วนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง เลือกรูปการทดสอบที่ให้ผลบวกนำไปทดสอบหาค่า MIC และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ฆ่าราที่ใช้ทดสอบได้ (minimal fungicidal concentration, MFC) ต่อไป

2.5 การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดมะยมที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบและความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ฆ่าจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้

ทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดจาก

มะยมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยใช้ broth microdilution technique บน microtiter plate ร่วมกับการใช้ resazurin ตรวจจับการเจริญของแบคทีเรีย ที่ดัดแปลงวิธีการจาก Sarker และคณะ (2007) โดยเจือจางสารสกัดมะยมแบบลำดับส่วน 2 เท่า ด้วยอาหารเหลว MHB ปลอดเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ได้สารละลายสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.91, 1.95 และ 0.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นสุดท้าย ตามลำดับ แล้วเติมแบคทีเรียทดสอบที่ปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 5×10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบา ๆ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เติมสารละลาย resazurin เข้มข้น 0.18 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยพิจารณาจากสีของ resazurin เทียบกับชุดทดลองควบคุม ค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใน well plate ที่ไม่เกิดการเปลี่ยนสีม่วงน้ำเงินของ resazurin ไปเป็นสีชมพู ทดสอบหาค่า MBC ของสารสกัดโดยใช้ agar dilution technique โดยใช้รูปถ่ายเชื้อตะแคงอาหารเลี้ยงจากหลุมที่มีสีม่วงน้ำเงินมา streak บนอาหารแข็ง MHA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยพิจารณาจากการเจริญของแบคทีเรีย ค่า MBC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใน well plate ที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

ทดสอบหาค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ โดยใช้ broth dilution technique โดยเจือจางสารสกัดแบบลำดับส่วน 2 เท่า ด้วยอาหารเหลว sabouraud ปลอดเชื้อปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ ได้สารละลายสารสกัดปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของสารสกัด

เท่ากับ 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.91, 1.95 และ 0.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เติมน้ำยีสต์ที่ปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มโดยการเขย่าเบา ๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจการเจริญของยีสต์โดยการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu UV-1601, Japan) ที่เวลา 16 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับความขุ่นที่ความยาวคลื่นเดียวกันที่ระยะเวลาเริ่มต้น โดยที่ค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในหลอดทดสอบที่ไม่พบความแตกต่างของค่าความขุ่นของเซลล์ที่เวลา 0 และภายหลังการบ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทดสอบหาค่า MFC ของสารสกัด โดยถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นมาลาบอาหารแข็ง sabouraud บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่า MFC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในหลอดทดสอบที่ไม่พบการเจริญของยีสต์บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ

2.6 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging capacity assay

วิธี DPPH radical scavenging capacity assay ใช้วิธีของ Yamasaki และคณะ (1994) โดยใช้ DPPH reagent ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดจากมะยมปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่แปรผันความเข้มข้น คือ 0, 1, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (BioTek Power wave XS, USA) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT (butylated hydroxytoluene) ความเข้มข้น 0, 0.2, 2, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เป็นชุดควบคุมผลบวก และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] จากสูตร % DPPH[•] inhibition = $[(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) \div A_{\text{Control}}] \times 100$

2.7 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay

วิธี ABTS radical cation decolorization assay ใช้วิธีของ Re และคณะ (1999) โดยเตรียม ABTS^{•+} ด้วยการบ่มสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะที่มีโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 12-16 ชั่วโมง แล้วเจือจางสารละลาย ABTS^{•+} ที่ได้ด้วยเอทานอลก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ปรับให้ค่าอยู่ในช่วง 0.7 (± 0.02) ก่อนใช้ทุกครั้ง ใช้สารละลาย ABTS^{•+} ปริมาตร 180 ไมโครลิตร บ่มกับสารละลายสารสกัดมะยมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่แปรผันความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 1, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการใช้สารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} จากสูตร % ABTS^{•+} + Inhibition = $[(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) \div A_{\text{Control}}] \times 100$

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างโดยใช้ linear equation (Graph Pad Prism 4) รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถลดความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์ (50 % inhibition concentration, IC₅₀)

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (Velioglu *et al.*, 1998) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 240 และ 480 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 525 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง microplate reader แล้วเติม 1x Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 525 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมะยมเปรียบเทียบกับ gallic acid (gallic acid equivalents) จากกราฟมาตรฐาน

3. ผลการทดลอง

3.1 สารสกัดหยาบเอทานอลจากใบและลำต้นมะยม

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบและลำต้นมะยมที่ผ่านการอบและบด น้ำหนัก 1.0 กิโลกรัม ด้วยเอทานอล เมื่อระเหยตัวทำละลายละลายออกจนหมด จะได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเหนียวข้น โดยสารสกัดใบมะยมที่สกัดได้มีน้ำหนัก 103.2 กรัม ส่วนสารสกัดจากลำต้นมะยมที่สกัดได้หนัก 49.6 กรัม คิดเป็น 10.32 และ 4.96 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

3.2ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสัญญาณแคลเซียมของสารสกัดมะยม

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งสัญญาณแคลเซียมโดยพิจารณาจากวงการเจริญรอรอยหยุดของสารทดสอบของ *S. cerevisiae* YNS17 ที่มี

การกลายของ *zds1* ภายใต้สภาวะการกระตุ้นสื่อสัญญาณแคลเซียมจาก $CaCl_2$ 165 มิลลิโมลาร์ ที่เติมลงไปให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับชุดทดลองผลบวก คือ FK506 และชุดควบคุมผลลบคือเอทานอล พบว่าสารสกัดใบมะยมความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตรออกฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งสื่อสัญญาณแคลเซียม (Figure 1) โดยพบวงการเจริญของยีสต์รอรอยหยุดสารละลายสารสกัดเหมือนกับวงการเจริญของยีสต์รอรอยหยุดของ FK506 แต่ความหนาแน่นของเซลล์ยีสต์ที่เจริญรอรอยหยุดสารสกัดมีความหนาแน่นของเซลล์น้อยกว่าชุดควบคุมผลบวก ผลการทดสอบที่ใช้สารสกัดที่มีการเจือจางลำดับส่วนแบบ 3 เท่า แสดงให้เห็นว่าความหนาแน่นของเซลล์ยีสต์ที่เจริญรอรอยหยุดจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลดลง และไม่พบวงการเจริญรอรอยหยุดเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะยมที่ใส่ลดลงต่ำกว่า 333.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ปริมาณเนื้อสาร 1.67 มิลลิกรัม) และทดสอบไม่พบการออกฤทธิ์ยับยั้งสื่อสัญญาณแคลเซียมของสารสกัดจากลำต้นมะยม

3.3 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบและลำต้นมะยมในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* กับ *E. aerogenes* แบคทีเรียแกรมบวก คือ *B. subtilis* กับ *S. aureus* และยีสต์ คือ *S. cerevisiae* กับ *C. albicans* ด้วยวิธี disc diffusion โดยใช้สารสกัดสมุนไพรเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากลำต้นมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ดีที่สุด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้ 10.72 ± 0.08 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *B. subtilis* และ *E. aerogenes* มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 10.50 ± 0.05 และ 10.24 ± 0.08 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Table 1) และยิ่งพบว่า

สารสกัดลำต้นมะยมที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิตร ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *B. subtilis* วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง ได้ 9.51 ± 0.03 และ 7.67 ± 0.04 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากใบมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียได้เฉพาะ *B. subtilis* เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากลำต้น 1,000 และ 500 มิลลิกรัมต่อ มิลลิตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 10.84 ± 0.08 และ 8.20 ± 0.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดจากใบและลำต้นมะยมความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อ มิลลิตร ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*

สารสกัดจากลำต้นและจากใบสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* โดยสารสกัดจากลำต้นเข้มข้น 1,000 และ 500 มิลลิกรัมต่อ มิลลิตร ยับยั้ง *S. cerevisiae* มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 19.34 ± 0.05 และ 9.52 ± 0.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดจากใบที่ความเข้มข้นเดียวกันมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง *S. cerevisiae* 17.83 ± 0.06 และ 9.55 ± 0.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ และพบว่า *C. albicans* ถูกยับยั้งการเจริญเมื่อใช้สารสกัดจากใบมะยมเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อ มิลลิตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 9.73 ± 0.04 มิลลิเมตร (Table 1)

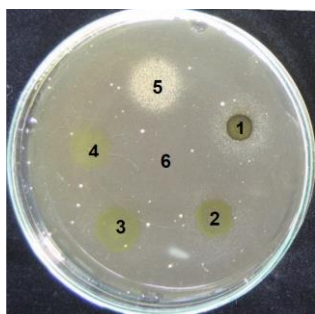


Figure 1 Ethanolic crude leaf extract of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels restores the growth suffering from the hyper-activation of Ca^{2+} -signal of *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta zds1$. Ethanolic crude extract, positive and negative solution control was applied on semi-solid YPD soft agar containing 165 mM CaCl_2 and 2.4×10^6 YNS17 yeast cells, incubated at 30 °C for 36-48 h. (1 = 5 μL of 1,000 mg/mL crude extract (5 mg); 2-4 = 5 μL of 3-folds serial diluted 1,000 mg/mL of crude extract (1.67-0.18 mg); 5 = 3 μL of 0.2 μM FK506, positive control; and 6 = 5 μL of absolute ethanol, negative control)

Table 1 Antimicrobial activity of crude ethanolic extract from stem part and leaf part of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels by disc diffusion assay

Extract/ Control	Zone of inhibition (mm) \pm S.D.					
	<i>E. coli</i> TISTR780	<i>E. aerogenes</i> TISTR1540	<i>B. subtilis</i> TISTR008	<i>S. aureus</i> TISTR885	<i>S. cerevisiae</i> TISTR5013	<i>C. albicans</i> TISTR5779
Stem	NC	10.24 ± 0.08	10.50 ± 0.05	10.72 ± 0.08	19.34 ± 0.05	NC
Leaf	NC	NC	10.84 ± 0.08	NC	17.83 ± 0.06	9.73 ± 0.04
Streptomycin	26.22 ± 0.05	18.12 ± 0.03	26.71 ± 0.05	21.11 ± 0.02	NT	NT
Ketoconazole	NT	NT	NT	NT	15.22 ± 0.01	21.11 ± 0.01

S.D. = standard deviation; NC = no clear zone; NT = not tested; 20 μL of 2.5 mg/mL streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{disc}$); 20 μL of 50 mg/mL ketoconazole (1 mg/disc); 20 μL of 1,000 mg/mL crude extract in ethanol (20 mg/disc)

3.4 ค่า MIC และ MBC/MFC ของสารสกัด

ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากลำต้นและใบมะยมในการยับยั้ง *E. aerogenes*, *B. subtilis* และ *S. aureus* (Table 2) เห็นได้ว่าสารสกัดจากลำต้นสามารถยับยั้งการเจริญและฆ่า *S. aureus* ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 7.81 และ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมา คือ *B. subtilis* มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 62.5 และ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ *E. aerogenes* มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบสามารถยับยั้งการ

เจริญ *B. subtilis* มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 62.5 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ค่า MIC และ MFC ของสารสกัดจากลำต้นและใบมะยมที่มีต่อ *S. cerevisiae* และ *C. albicans* (Table 2) พบว่าสารสกัดจากลำต้นมีค่า MIC และ MFC ต่อ *S. cerevisiae* เท่ากับ 125 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบมีค่า MIC และ MFC ต่อเชื้อเดียวกัน 62.5 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MIC และ MFC ต่อ *C. albicans* เท่ากับ 31.25 และ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Table 2 MIC and MBC of crude ethanolic extract from stem part and leaf part of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels

Extract	Concentration (mg/mL)											
	<i>E. coli</i> TISTR780		<i>E. aerogenes</i> TISTR1540		<i>B. subtilis</i> TISTR008		<i>S. aureus</i> TISTR885		<i>S. cerevisiae</i> TISTR5013		<i>C. albicans</i> TISTR5779	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC	MIC	MFC
Stem	NT	NT	250	500	62.50	500	7.81	31.25	125	250	NT	NT
Leaf	NT	NT	NT	NT	62.50	250	NT	NT	62.50	250	31.25	125

NT = not tested

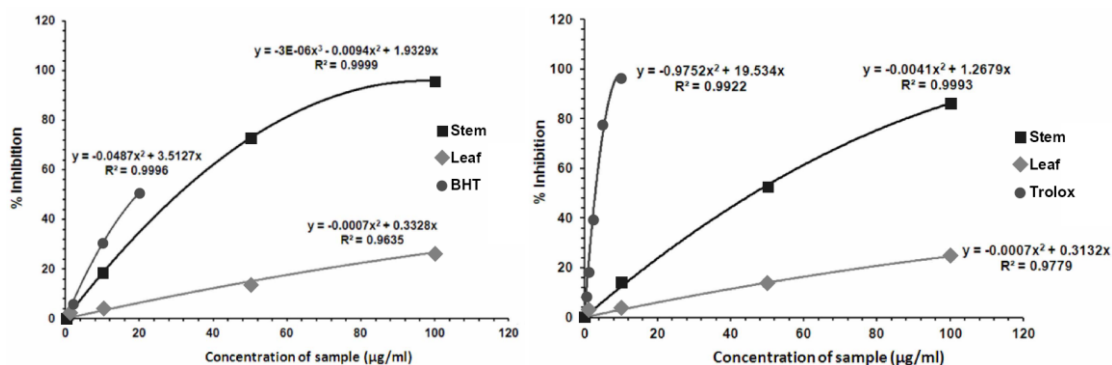


Figure 2 Percentage inhibition of free DPPH radical (Left) and ABTS radical cation (Right) in the presence of different concentration of ethanolic crude extract of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels

3.5 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS^{•+}

สารสกัดจากลำต้นมะยมมีค่าการต้าน DPPH[•] เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น นั่นคือ สารสกัดจากลำต้นที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้าน DPPH[•] เท่ากับ 8.80±1.06, 23.10±4.91, 75.17± 7.79 และ 94.60±1.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 2 Left) โดยสารสกัดจากลำต้นมะยมมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 30.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกันส่วนสารสกัดใบมะยมมีฤทธิ์ต้าน DPPH[•] เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น โดยสารสกัดจากใบมะยมความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การต้าน DPPH[•] เท่ากับ 3.04±0.96, 3.50± 0.97, 14.89± 0.64 และ 26.56± 0.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าค่า IC₅₀ ของสารสกัดจากใบนั้นมีความมากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้าน DPPH[•] ของสารสกัดจากต้นมะยมกับสารละลายมาตรฐาน BHT พบว่าค่า IC₅₀ ของสารสกัดลำต้นซึ่งมีค่า 30.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั้น มีค่าสูงกว่าค่า IC₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน BHT ที่มีค่า 19.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่ค่า IC₅₀ ที่น่าเชื่อถือของ BHT ในกรณีของ DPPH คือ 10-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ฤทธิ์การต้าน ABTS^{•+} ของสารสกัดจากลำต้นและใบมะยมแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด (Figure 2 Right) นั่นคือ เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น เปอร์เซ็นต์การต้าน ABTS^{•+} ก็ จะเพิ่มมากขึ้น โดยสารสกัดจากลำต้นมะยมเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การต้าน ABTS^{•+} เท่ากับ 2.12±0.00, 13.92± 0.02, 52.60± 0.01 และ 86.26± 0.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีค่า IC₅₀ ของสารสกัดจาก

ลำต้นมะยม 46.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากใบมะยมที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน มีเปอร์เซ็นต์การต้าน ABTS^{•+} เท่ากับ 3.172±0.003, 3.877±0.005, 13.568±0.007 และ 24.670±0.012 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า IC₅₀ มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่เปอร์เซ็นต์การต้าน ABTS^{•+} ของสารมาตรฐาน คือ Trolox ที่ระดับความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า 8.493±0.005, 18.904± 0.006, 39.726±0.007, 78.082±0.009 และ 96.895 ±0.001 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยจะมีค่า IC₅₀ อยู่ที่ 3.013 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพสูงในการเป็นสารต้าน ABTS^{•+}

3.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเอทานอลจากลำต้นมะยมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเปรียบเทียบกับเป็น gallic acid เท่ากับ 68.95±0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ของสารสกัดส่วนสารสกัดเอทานอลจากใบมะยมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเปรียบเทียบกับเป็น gallic acid เท่ากับ 47.37±0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ของสารสกัด

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

การสกัดสารออกออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากลำต้นและใบมะยมด้วยเอทานอลนั้น เอทานอลเป็นตัวทำละลายชนิด polar protic มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) ที่มีธาตุออกซิเจนซึ่งมีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตี (electronegativity) สูงที่ทำให้สร้างพันธะไฮโดรเจนได้กับโมเลกุลอื่นได้ และมีหมู่เอทิล (C₂H₅) เป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว (non-polar) ดังนั้นสารที่ละลายได้ในเอทานอลจึงเป็นทั้งสารชนิดที่มีขั้วและสารชนิดที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นสารสกัดหยาบเอทานอลที่ได้จึงมีองค์ประกอบของสารทั้งชนิดที่มีขั้วและชนิดที่ไม่มีขั้ว ปริมาณผลผลิตสารสกัดจากใบมะยมที่

สกัดได้มีน้ำหนักมากกว่าสารสกัดจากลำต้นมะยม อาจเนื่องจากใบมะยมมีองค์ประกอบของสารที่สกัดได้ด้วยเอทานอลมากกว่าลำต้นมะยม และยังอาจเป็นไปได้ว่าโครงสร้างของเซลล์ส่วนลำต้นมีความแข็งแรงกว่าโครงสร้างของเซลล์ส่วนของใบ จึงทำให้การสกัดองค์ประกอบของสารด้วยตัวทำละลายทำได้ยากกว่า ทำให้มีผลต่อปริมาณผลผลิตและองค์ประกอบสารสกัดที่ได้แตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการออกฤทธิ์ชีวภาพแตกต่างกัน รวมทั้งโมเลกุลเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ก็แตกต่างกันด้วย

แม้ว่าการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสัญญาณแคลเซียมของสารสกัดใบมะยมที่ได้ให้ผลการทดสอบเป็นบวกเมื่อเปรียบเทียบกับ FK506 ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก อย่างไรก็ตาม ความหนาแน่นของโคโลนียีสต์ที่เจริญรอบรอยหยดสารสกัดมีความหนาแน่นน้อยกว่าชุดควบคุมผลบวก อาจเนื่องจากสารสกัดใบมะยมมีองค์ประกอบของสารอื่นนอกเหนือจากองค์ประกอบของสารที่ออกฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งเชื้อสัญญาณแคลเซียม ในขณะที่ FK506 หรือ tacrolimus เป็นสารบริสุทธิ์ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวกเคยมีรายงานมาก่อนหน้าแล้วว่าเป็นตัวยับยั้ง calcineurin อันเป็นโมเลกุลในสัญญาณแคลเซียม (Rusnak and Mertz, 2000) และใช้เป็นสารกดภูมิคุ้มกันที่นิยมใช้ในการบำบัดผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะ จึงแสดงผลของการยับยั้งเชื้อสัญญาณแคลเซียมที่ถูกกระตุ้นให้แสดงออกมากเกินไปได้อย่างชัดเจน การศึกษานี้ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสัญญาณแคลเซียมจากสารสกัดลำต้นมะยม บ่งชี้ว่าสารสกัดที่ได้จากต้นและใบมะยมมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสัญญาณแคลเซียมต่างกัน ทั้งนี้การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสัญญาณแคลเซียมสามารถคัดกรอง radicicol ที่เป็นสารต้านมะเร็ง Cyclosporin A ซึ่งเป็นสารกดภูมิคุ้มกันที่ยับยั้ง calcineurin โดย Cyclosporin A สามารถจับกับ immunophilin ซึ่งโปรตีนที่จับจำเพาะใน T cell คือ

cyclophilin แล้วไปยับยั้งการทำงานของ calcineurin สามารถคัดกรอง eremoxylarin ที่ยับยั้ง calcineurin ซึ่งเป็นโมเลกุลเป้าหมายได้โดยตรง ไม่ต้องอาศัยการจับกับโปรตีนจำเพาะในการยับยั้งการทำงานของ calcineurin อีกทั้งสามารถคัดกรอง NKH7 และ pironetin ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้ง α -tubulin ที่เป็นหน่วยย่อยที่ประกอบกันกับ β -tubulin เป็น microtubule คัดกรอง isothiocyanate ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง GSK-3 β ซึ่งทั้ง tubulin และ GSK-3 β ต่างก็เป็นโมเลกุลเป้าหมายในการรักษามะเร็ง รวมถึงกรดไขมันไม่อิ่มตัว ricinoleic ที่มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์และสัตว์ (Shitamukai *et al.*, 2000; Chanklan *et al.*, 2008a; Chanklan *et al.*, 2008b; Okasawara *et al.*, 2008; Attrapadung *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2011)

มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกลำต้นมะยมด้วยเอทานอลในการยับยั้ง *E. coli*, *Salmonella Typhi* และ *Vibrio cholerae* ฤทธิ์ของสารสกัดจากผลมะยมด้วยเมทานอลที่ยับยั้ง *B. megaterium*, *B. subtilis*, *S. Typhi* และ *Shigella dysenteriae* รวมถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากผลมะยมด้วยคลอโรฟอร์มและฤทธิ์ของสารสกัดใบมะยมด้วยเอทานอลที่สามารถยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus*, *S. dysenteriae* และ *C. albicans* (Jagessar *et al.*, 2008; Habib *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2011; Subrata *et al.*, 2011) การที่ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียในงานวิจัยนี้ต่างไปจากรายงานที่กล่าวมาข้างต้น อาจเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบต่างกัน รวมถึงแหล่งตัวอย่างใบมะยมที่ใช้ศึกษามาจากแหล่งปลูกที่ต่างกัน จึงมีปัจจัยทางกายภาพในนิเวศนั้นต่างกันไป ไม่ว่าจะเป็นปริมาณน้ำฝน อุณหภูมิ ปริมาณแสงแดด พีเอช และสารอินทรีย์ รวมถึงไปแตสเซียมอออนในดิน ซึ่งจะส่งผลต่อการสร้างและสะสมสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ต่างกัน (Lui *et al.*, 2015)

สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของมะยมในตัวยาละลายต่าง ๆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ต่างกัน เช่นงานวิจัยของ Rahman และคณะ (2011) และ Habib และคณะ (2011) ที่รายงานว่าการสกัดผลมะยมด้วยเมทานอลและสารสกัดผลมะยมด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ปานกลาง โดยให้ค่า IC₅₀ ของสารสกัด 2063.42 และ 2745.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก และ Nguyen และคณะ (2017) รายงานฤทธิ์ของสารสกัดใบมะยมด้วยเอทานอลและสารสกัดใบมะยมด้วยน้ำในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] โดยให้ค่า IC₅₀ ของสารสกัด 95.32 และ 88.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ที่ให้ค่า IC₅₀ ของสารสกัดเท่ากับ 1462.29 และ 932.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยผู้วิจัยอภิปรายไว้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อสารสกัดที่ได้มีปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น รายงานวิจัยนี้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบมะยมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS^{•+} อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีระดับแตกต่างกัน เนื่องจากแหล่งที่ได้มาของตัวอย่างและนิเวศที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อการสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ต่างกัน

นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนต่าง ๆ จากมะยม เช่น ฤทธิ์ต้านไวรัสกลุ่ม hepadnavirus DNAp จึงสามารถนำไปใช้บำบัดโรคตับอักเสบที่เกิดจากการป่วยเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Unander *et al.*, 1995) รวมถึงรายงานสารชนิดใหม่ที่เป็นพิษต่อเซลล์ คือ norbisabolane glycoside ที่ละลายได้ในน้ำ คือ phyllanthusol A และ phyllanthusol B ที่สกัดจากรากมะยมด้วยเมทานอลที่คาดว่าจะเป็นสารประกอบหลักที่ทำให้ผู้ป่วยที่ผ่านการบำบัดอาการติดเชื้อด้วยสารสกัดจากรากมะยมเกิดอาการป่วย

เรื้อรัง (Vongvanich *et al.*, 2000) มีรายงานผลของสารสกัดบิวทานอลจากใบมะยมที่มีต่อการลดความดันโลหิตในหนู โดยสารสกัดบิวทานอลจากใบมะยมจะช่วยขยายหลอดเลือดบริเวณทรวงอกที่เกิดตีบตันอันมีสาเหตุจาก phenylephrine หรือจากโปแตสเซียมคลอไรด์ (Leeya *et al.*, 2010) และมีรายงานการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญของสารสกัดใบมะยมด้วยน้ำที่ลดความเป็นพิษของ acetaminophane (APAP) และ thioacetamide (TAA) ซึ่งทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับหนูขาวใหญ่ (wistar rat) ได้ดีเทียบเท่ากับยาซิลิมาริน (silymarin) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก เนื่องจากน้ำสกัดใบมะยมมีสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Jain and Singhai, 2011) อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานถึงฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของมะยมในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสัณฐานแคลเซียม

5. สรุปผลการทดลอง

สารสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะยม นอกจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสัณฐานแคลเซียมแล้ว ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ คือ *B. subtilis*, *S. cerevisiae* และ *C. albicans* ส่วนสารสกัดหยาบเอทานอลจากลำต้นมะยมนั้นไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสัณฐานแคลเซียม แต่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. aerogenes* และแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และ *B. subtilis* นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. cerevisiae* ได้ด้วยเช่นกัน นอกจากนี้สารสกัดต้นมะยมยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS^{•+} สูงกว่าสารสกัดจากใบมะยม อีกทั้งสารสกัดจากลำต้นมะยมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดจากใบมะยมอีกด้วย งานวิจัยนี้เป็นรายงานฉบับแรกที่เปิดเผยถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสัณฐานแคลเซียมของสารสกัดจากใบมะยม ทั้งนี้องค์ประกอบทางเคมี

ของสารออกฤทธิ์ในใบมะยมดังกล่าวกำลังอยู่ในขั้นตอนการแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างทางเคมี เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาเพื่ออธิบายถึงกลไกในการออกฤทธิ์ยับยั้งสื่อสัญญาณแคลเซียมก่อนนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2553 และทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (MRG5280154)

7. รายการอ้างอิง

เต็ม สมิตินันท์, 2557, ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย, ใน ราชนันท์ ภูมา และสมราน สุดดี (บรรณาธิการ), ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557, สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช, กรุงเทพฯ.

Attrapadung, S., Yoshida, J., Kimura, K., Mizunuma, M., Miyakawa, T. and Thanomsub, B.W., 2009, Identification of ricinoleic acid as an inhibitor of Ca^{2+} signal mediated cell-cycle regulation in budding yeast, *FEMS Yeast Res.* 10: 38-43.

Bezprozvanny, I., 2009, Calcium signaling and neurodegenerative diseases, *Trends Mol. Med.* 15: 89-100.

Capiod, T., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N., 2007, Calcium signalling and cancer cell growth, *Subcell. Biochem.* 45: 405-427.

Chanklan, R., Aihara, E., Koga, S., Takahashi, H.,

Mizunuma, M. and Miyakawa, T., 2008a, Inhibition of Ca^{2+} - signaling-dependent growth regulation by radicicol in budding yeast, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 132-138.

Chanklan, R., Mizunuma, M., Kongkathip, N., Hasitapan, K., Kongkathip, N. and Miyakawa, T., 2008b, Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Tub1 α -tubulin as a potential target for NKH-7, a cytotoxic 1-naphthol derivative compound, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 1023-1031.

Habib, M.R., Sayeed, M.A., Rahman, M.M., Hasan, M.R. and Saha, A., 2011, *In vitro* evaluation of cytotoxic, antibacterial, antioxidant and phytochemical screening of petroleum ether extract of *Phyllanthus acidus*, *Int. J. Appl. Bio. Pharm. Tech.* 2: 420-427.

Jagessar, R.C., Mars, A. and Gomes, G., 2008, Selective antimicrobial properties of *Phyllanthus acidus* leaf extract against *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* using stokes disc diffusion, well diffusion, streak plate and a dilution method, *Nat. Sci.* 6: 24-38.

Jain, N.K. and Singhai, A.K., 2011, Protective effects of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels leaf extracts on acetaminophen and thioacetamide induced hepatic injuries in Wistar rats, *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4: 470-474.

Leeya, Y., Mulvany, M.J., Queiroz, E.F., Marston, A., Hostettmann, K. and Jansakul C., 2010, Hypotensive activity of an n-

- butanol extract and their purified compounds from leaves of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels in rats, Eur. J. Pharmacol. 649: 301-313.
- Lui, W., Lui, J., Yin, D. and Zhao, X., 2015, Influence of ecological factors on the production of active substances in the anti-cancer plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying, PLoS One. 10: e0122981.
- Nguyen, T.T.K., Laosinwattana, C., Teerarak, M. and Pilasombut, K., 2017, Potential antioxidant and lipid peroxidation inhibition of *Phyllanthus acidus* leaf extract in minced pork, Asian-Australas. J. Anim. Sci. 30: 1323-1331.
- Ogasawara, Y., Yoshida, J., Shiono, Y., Miyakawa, T. and Kimura, K., 2008, New Eremophilane sesquiterpenoid compounds, Eremoxylarins A and B directly inhibit calcineurin in a manner independent of immunophilin, J. Antibiot. 61: 496-502.
- Rahman, M.M., Habib, M.R., Hasan, S.M.R., Sayeed, M.A. and Rana, M.S., 2011, Antibacterial, cytotoxic and antioxidant potential of methanolic extract of *Phyllanthus acidus* L., Int. J. Drug Dev. Res. 3: 154-161.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radic. Biol. Med. 26: 1231-1237.
- Rusnak, F. and Mertz, P., 2000, Calcineurin: Form and function, Physiol. Rev. 80:1483-1521.
- Sarker, S.D., Nahar, L. and Kumarasamy, Y., 2007, Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals, Methods 42: 321-324.
- Shitamukai, A., Mizunuma, M., Hirata, D., Takahashi, H. and Miyakawa, T., 2000, A Positive screening for drugs that specifically inhibit the Ca²⁺ - signaling activity on the basis of the growth promoting effect on a yeast mutant with a peculiar phenotype, Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 1942-1946.
- Subrata, K.B., Anusua, C., Joysree, D., Utpal, K.K., Manik, C.S., and Sheikh, Z.R., 2011, Assessment of cytotoxicity, antibacterial activity and phytochemical screening of ethanol extract of *Phyllanthus acidus* L. (family: Euphorbiaceae) bark, J. Appl. Pharm. Sci., 6:112-114.
- Unander, D.W., Webster, G.L. and Blumberg, B.S., 1995, Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effect, J. Ethnopharmacol. 45: 1-18.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B.D., 1998, Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, J. Agric. Food Chem. 46: 4113-4117.
- Vongvanich, N., Kittakoop, P., Kramyu, J., Tanticharoen, M. and Thebtaranonth, Y., 2000, Phyllanthusols A and B, cytotoxic

- norbisabolane glycosides from *Phyllanthus acidus* Skeels, J. Org. Chem. 65: 5420-5423.
- Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T., 1994, Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 42: 1663-1665.
- Yoshida, J., Nomura, S., Nishizawa, N., Ito, Y. and Kimura, K., 2011, Glycogen synthase kinase-3 β inhibition of 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate derived from wasabi (*Wasabi japonica* Matsum), Biosci. Biotechnol. Biochem. 75: 136-139.